

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-117245
 (43)Date of publication of application : 17.04.1992

(51)Int.CI. A23L 1/00
 A01N 25/28
 A23L 1/28
 A61K 9/50
 A61K 9/66
 B41M 5/165
 C12N 1/14
 //C12N 1/14
 C12R 1:865)

(21)Application number : 02-235636

(71)Applicant : MITSUBISHI PAPER MILLS LTD
 KIRIN BREWERY CO LTD

(22)Date of filing : 07.09.1990

(72)Inventor : ISHIGURO MAMORU
 ISHIWAKI NAOTAKE**(54) PRODUCTION OF MICROCAPSULE****(57)Abstract:**

PURPOSE: To obtain the subject microcapsules capable of freely controlling the capsule film strength or film characteristics according to the purpose by treating yeast fungi with an enzyme capable of dissolving the cell walls of the yeast fungi in producing microcapsules enclosing a hydrophobic liquid in the microbial cells of the yeast fungi.

CONSTITUTION: Microcapsules enclosing a hydrophobic liquid (e.g. cottonseed oil, soybean oil or fish oil) in microbial cells of yeast fungi are produced. In the process, the yeast fungi are treated with an enzyme (preferably an enzyme produced by β -1,3-glucanase) capable of dissolving cell walls of the yeast fungi (e.g. *Saccharomyces.cerevisiae*).

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑩ 日本国特許庁(JP) ⑪ 特許出願公開
 ⑫ 公開特許公報(A) 平4-117245

⑬ Int. Cl. 5	識別記号	府内整理番号	⑭ 公開 平成4年(1992)4月17日
A 23 L 1/00	C	6977-4B	
A 01 N 25/28		6742-4H	
A 23 L 1/28	Z	8114-4B	
A 61 K 9/50	A	7624-4C	
9/66		7624-4C	
B 41 M 5/165	J	9050-4B	
C 12 N 1/14			
//(C 12 N 1/14			
C 12 R 1:865)			
		8305-2H B 41 M 5/12 112	
		審査請求 未請求 請求項の数 1 (全6頁)	

⑮ 発明の名称 マイクロカプセルの製造方法

⑯ 特願 平2-235636

⑰ 出願 平2(1990)9月7日

⑲ 発明者 石黒 守 茨城県つくば市和台46番地 三菱製紙株式会社筑波研究所内

⑳ 発明者 石脇 尚武 群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社内

㉑ 出願人 三菱製紙株式会社 東京都千代田区丸の内3丁目4番2号

㉒ 出願人 麒麟麦酒株式会社 東京都渋谷区神宮前6丁目26番1号

㉓ 代理人 弁理士 浅村皓 外3名

明細書

1. 発明の名称

マイクロカプセルの製造方法

2. 特許請求の範囲

酵母團体内に疎水性液体を内包してなるマイクロカプセルの製造方法において、酵母團の細胞壁を溶解する酵素で酵母團を処理することを特徴とするマイクロカプセルの製造方法。

3. 発明の詳細な説明

【産業上の利用分野】

本発明は、酵母團の細胞壁をマイクロカプセル皮膜として有するマイクロカプセルの製造方法に関するものである。更に詳しくは使用目的に応じてマイクロカプセル皮膜の物理的強度や皮膜特性を自由に制御し得るマイクロカプセルの製造方法に関するものである。

【従来の技術】

マイクロカプセルは1μm～数百μmまでの大きさの微粒子として液体、固体、気体を内包し、そのまわりを薄い皮膜で均一に覆ったものであり、

具体的には、無色及び有色染料、医薬品、農薬、香料、飼料素材及び食品素材等を内包させたマイクロカプセルが工業的に製品化されている。

マイクロカプセルは、ある特性をもった物質の外側に薄膜を形成させることでその特性も同時に封じ込めてしまうことが可能で、必要時に皮膜を破壊すれば内包された物質を取り出すことができるものである。

従来より知られているマイクロカプセルの製造方法としては、

(1) ゼラチンによるコアセルベーション法(米国特許第2800457号、同2800458号明細書など)

(2) 外相(水相)より皮膜を形成するin situ法(特公昭36-9168号、同47-28165号、特開昭48-57892号、同51-9079号、同54-49984号、同54-25277号公報等)

(3) 内相と外相間の皮膜形成反応を利用した界面重合法

が有力な方法として知られている。

また、微生物を利用したマイクロカプセルの製造方法として、次のものが知られている。例えば、米国特許第4001480号明細書においては脂質含有量が40～60%の真菌類中に、その脂質に可溶性の物質をカプセル化する方法が紹介されている。

さらに、特開昭58-107189号公報では、成長微生物の脂質含有量の増量方法として、培地から回収した脂質含量10wt%以上の成長微生物（例えば油脂形成性酵母菌、麦酒酵母菌など）に脂質増量用有機物質（例えば脂肪族アルコール類、エステル類、芳香族炭化水素類、水添芳香族炭化水素類）から選択される液体を包含せしめた後、これら脂質増量用有機物質に可溶な芯物質となるべき液体をカプセル化してなる微生物カプセルを挙げている。

【発明が解決しようとする課題】

上記カプセル化法においては、内包物の保護力に優れた緻密な皮膜を有するマイクロカプセルが

得られ、工業的にも広く応用されているものもあるが、製造面について数々の問題点を有していることも事実である。すなわち、（1）のコアセルベーション法については反応に係わるpH、温度、時間操作が複雑であり、またカプセル化工程に長時間を要する等の問題点を有する。

（2）の*in situ* 法及び（3）の界面重合法については、反応性の高い皮膜基材を比較的高温で反応させるため、不安定な物質あるいは熱変性しやすい物質のカプセル化には向かない、等の欠点を有している。

また、微生物を利用したマイクロカプセル化法は天然物、しかも生物体の一部を素材として用い、カプセル化のメカニズムも従来の方法とは全く性質を異にしたものである。しかし、これらの前記特許明細書中の実施例を見るに、初期添加酵母菌（膜材）が内包し得る疎水性液体の量が現在工業的に用いられている方法に比べ相対的に少なく、しかも多量に採取させようとすればカプセル化に長時間を要するという欠点を有している。

本発明者らは、これらの提案に基づき、微生物を利用したマイクロカプセルを作成し、感圧複写紙を製造し、タイプライター筆記等による発色性の比較を行なったところ、前記（1）コアセルベーション法や（2）*in situ* 法により得られるマイクロカプセルと比較して皮膜となる部分の物理的強度が高いためか、得られたシート上には同等量の染料が塗抹されているのにもかかわらず相対的に低い発色濃度しか得られず、特に多数枚の複写を得ることは困難であった。

本発明は微生物を利用したマイクロカプセル化法において、単位菌体量に多量の疎水性液体を迅速に採取し得ることを可能にし、しかも通常の取り扱い時には堅牢性に富む皮膜であるが、内包された物質を取出したい際には効率よく破壊し得る皮膜を有するマイクロカプセルの製造方法を提供するものである。

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、微生物を用いたカプセル化法の前記問題点を解決すべく検討したところ、次の

手法により解決されることを見いだした。すなわち、本発明は酵母菌体内に疎水性液体を内包してなるマイクロカプセルの製造方法において、酵母菌の細胞壁を溶解する酵素で酵母菌を処理することを特徴とするものである。以降、酵母菌の細胞壁を溶解する酵素を酵母細胞壁溶解酵素と略称する。

〈酵母菌〉

本発明で使用される酵母菌とは、出芽もしくは分裂により増殖する微生物の総称である。具体的には、例えば、

サッカロマイセス属の

サッカロマイセス・セレビッシュ

(*Saccharomyces cerevisiae*)

サッカロマイセス・ルーキシ

(*Saccharomyces rouxii*)

サッカロマイセス・カールスバーゲンシス

(*Saccharomyces carlsbergensis*)

キャンディダ属の

キャンディダ・ウティリス

(Candida (lili)

キャンディダ・トロビカリス

(Candida tropicalis)

キャンディダ・リポリティカ

(Candida lipolytica)

キャンディダ・フレーベリ

(Candida flaveri)

等が使用できる。

酵母菌の形状は種類によって種々の形があるが、なるべく球形に近い形態のものが好ましく、粒径は1~20 μmの範囲が好ましい。

本発明で用いられるこれら酵母菌は、生のままでも乾燥した状態でもよく、さらに増殖能力のない死滅した状態でもよい。

酵母菌は、必要に応じ適当な処理を行ったものでもよい。例えば、これらの母菌中には、水もしくは極性溶剤に可溶性の酵素及びタンパク質、アミノ酸成分、糖質分、核酸成分等の菌体内組織が存在しているが、疎水性液体を多量に内包させるために、これら菌体内成分を種々の方法で抽出処

理した後の酵母菌残渣を用いることもできる。

これらの酵母菌、もしくは酵母菌残渣は、必要に応じ適当な分散剤を用い、水溶液中に分散される。

<酵母細胞壁溶解酵素>

本発明で用いられる酵母細胞壁溶解酵素は、プロテアーゼ以外の酵母細胞壁を溶解する酵素であればいずれでもよい。すなわち、酵母の細胞壁はグルカン、マンナン、及びこれらの多糖類と蛋白の複合体、キチン等から構成され、これらの構成成分を分解する酵素であれば、いずれも用いることができる。本発明で用いられる細胞壁溶解酵素としてはグルカナーゼ、マンナナーゼ、キチナーゼ等が挙げられるが中でもグルカナーゼ、マンナナーゼが好ましく、特にβ-1, 3グルカナーゼを主成分とする微生物が産生する酵素が好ましい。これらの酵素は単独で用いてもよいし2種以上併用してもよい。これらの酵素は試薬として入手することもできるし、これらの酵素を主成分とする下記酵素としても入手できる。

アースロバクターの產生する酵素（キリンビル酵製ザイモリエース20T）、坦子菌の產生する酵素（クミアイ化学酵製キタラーゼ）、アクロモバクターの產生する酵素（天野製薬酵製Y-L-05）。

また、船津・鶴編「溶菌酵素」講談社（1977年）P. 169~191に記載の種々の細胞壁溶解酵素、その他を用いることができる。

<酵母細胞壁の溶解処理>

溶解処理は、酵母細胞壁を部分的に溶解して薄膜化または軟化させるために行う。その程度は、製造したマイクロカプセルの用途に応じて、所望の物理的強度及び/又は皮膜特性（例えば徐放性）が得られるよう細胞壁を溶解させる。すなわち常法に従って酵母菌に酵母細胞壁溶解酵素を作用させ、所望の皮膜強度等が得られるような酵素の添加量、処理条件を設定するか、又は所望の皮膜強度が得られた時点で酵素反応を停止させることにより行う。

通常多くの酵素の至適条件として、pHは4~

9、温度は30~60°Cの範囲にあり、酵素の添加量も基質1gに対し0.1~100mgの範囲で用いられる。反応時間は上記条件によって最適時間が設定されるが通常約10分以上、好ましくは約30分~約5時間である。酵素反応の停止方法は、遠心分離、洗浄などにより酵母菌と酵素を分離する方法、加熱、pH調整、あるいは失活剤などにより酵素を失活させる方法、その他適当な方法を用いればよいが、酵母細胞壁の損傷、劣化を生じない方法が選択される。具体的な酵素反応の停止時点は、製造したマイクロカプセルの中から目的の用途に適するマイクロカプセルが得られる条件を選べば良い。酵母細胞壁がどの程度溶解したかは、酵素反応により細胞壁は糖に分解されるため、酵母菌分散液のろ液中に存在する全糖量を定量することにより判断できる。例えば感圧復写紙用のマイクロカプセルの場合にはカプセルが熱、温度、あるいはまた各種印刷、機器作業時に破壊されないことが必要である。これら通常の取り扱い工程において充分なカプセルの堅牢性を発

揮するためには糖溶出率（実施例参照）を約0.5～約4.0%、特に約1%～約2.0%に調整することが好ましい。糖溶出率がこの範囲以下の値であると本発明の効果は充分には発現せず、この範囲より高い値に溶出させたものは得られたカプセルの皮膜の堅牢性に乏しいものとなり、例えば感圧復写紙用に加工した場合には、熱、湿度、溶剤等の外的要因によって壊れ易くなり商品価値に乏しいものとなる。また、場合によってはカプセル化工程中に酵母菌が崩壊してしまい満足なカプセルが得られないこともあり得る。

本発明のマイクロカプセルの製造方法において、酵母細胞壁溶解酵素による処理を行なう時期は特に制限はなく、カプセル化工程前に行なっても後に行なってもよく、また、疎水性液体のカプセル化と同時に行なっても良い。

〈疎水性液体のカプセル化〉

本発明で用いられる酵母菌中に内包される疎水性液体は、実質的に水不溶性の液体、もしくは加熱により液体となるものであれば使用可能であり、

油、大豆油、コーン油、オリーブ油、ヒマシ油、魚油、各種脂肪酸、各種ステロイド等の動植物から抽出される油性液体、また特に感圧復写紙用として利用する場合にはパラフィン油、塩素化パラフィン、塩素化ジフェニル、ジブチルタルート、ジオクチルタルート、ジブチルマレート、オージクロルベンゼン、ジイソプロピルナフタレンの如きアルキル化ナフタレン、1-フェニル-1-キシリルエタン等が挙げられる。これらの疎水性液体には目的に応じ、染料、香料、薬理活性物質、食品素材、飼料素材などを溶解もしくは分散され、得られたマイクロカプセルは感圧復写紙の他、化粧品、医薬品、食品、飼料、農薬等に使用される。当該物質は、それ自体が水溶性液体に非混和性の疎水性液体であれば上記疎水性液体に溶解、分散する事無く単独で使用することも可能である。

疎水性液体のカプセル化は、疎水性液体と酵母菌体を一定時間接触させることにより行なう。具体的には例えば、酵母菌体を適当な分散剤を用い、

水その他に分散させた酵母菌分散液と疎水性液体を混合搅拌することにより行われる。混合搅拌時の温度は特に限定はされないが、好ましくは20～100℃である。時間は普通1時間以上を要するが、内包される疎水性液体の量、温度などに応じて適宜設定すれば良い。また、より均一な状態で酵母菌と疎水性液体とを接触させるためにはアニオン系、ノニオン系等の乳化剤を含む水溶液で疎水性液体を乳化状態とした後添加混合した方が好ましい。更に必要に応じpH調節剤、防腐剤、紫外線劣化防止剤、酸化防止剤、耐水化剤その他を添加してカプセル化を行うこともできる。

【実施例】

以下に、本発明を実施例により詳細に説明する。なお、本発明は実施例に限定されるものではない。実施例及び比較例中に示された酵母菌重量は、全て乾燥状態での重量である。

実施例 1

〔菌体内成分の溶出処理工程〕

市販のパン酵母（雄洲化学工業製生酵母〔サッ

カロマイセス・セレビッシュ〕）10gを含む水分散液100gに、エタノール10gを添加した後、回転式振盪培養機中で温度40℃の条件下で24時間振盪し、菌体内的水溶性成分を菌体外に溶出させた。遠心分離操作により溶出液と酵母菌残渣を分離した後、溶出液の全量を105℃の乾燥器中で水分を蒸発させたところ、6.0gの不揮発成分为残り、初期添加酵母菌重量の40wt%が溶出したことが確認できた。

〔細胞壁溶解処理工程〕

この酵母菌残渣をpH8.0に調整したリン酸-水酸化ナトリウムバファーで100gとし、その分散液中に酵母細胞壁溶解酵素（キリンビール醸造、商品名ザイモリエース20T、主成分β-1,3-glucan laminarinpentosidase）を1mg添加し、40℃で2時間加温、搅拌処理を行ない酵母細胞壁の溶解処理を行なった。処理終了後遠心分離及び水洗を2度行ない酵素溶液を排除し全量を100gとした後、pHを10.0（ザイモリエースがほとんど作用しないpH域）に調

整した。

[カプセル化工程]

次に、乳化剤として0.5wt%のノニオン系界面活性剤（花王アトラス製、商品名Tween-80）水溶液20g中に、疎水性液体として3-N-メチルシクロヘキシルアミノ-6-メチル-7-アニリノフルオラン（新日曹化学製黒色発色染料、商品名PSD-150）1.1gを含む高沸点疎水性液体（日本石油化学製、商品名ハイゾールSAS N-296）22gを激しく搅拌しながら添加し、平均粒径5μmの疎水性液体の乳化液を得た。

この乳化液を酵母細胞壁溶解酵素で処理した酵母菌残渣分散液中に添加した後、回転式振盪機中で温度40℃、搅拌スピード200rpmの条件下で3時間振盪を続けた。その結果、疎水性液体は全て酵母菌中に内包され、マイクロカプセル化が完了した。このマイクロカプセル分散液をそのまま坪量40g/m²の上質紙に約5g/m²の塗抹量でバーコートを施したところ、発色良好な感圧

複写紙用上用紙が得られた。

実施例2

実施例1において菌体内成分の溶出処理工程を経ることなく細胞壁溶解処理工程として実施例1で用いた市販のパン酵母10gをpH7.0に調整した0.5%ポリアクリル酸ナトリウム水溶液（東亜合成化学工業製、商品名アロンT-40）中に添加し全量を100gに調整した後、酵母細胞壁溶解酵素（商品名キタラーゼ、クミアイ化学製プロトプラス化酵素、主成分β-1,3-glucanase）を6mg添加し40℃で2時間加熱搅拌を行ない細胞壁の溶解処理を行なった。処理終了後、遠心分離及び水洗を2度行ない酵素溶液を排除した後、再度0.5%アロンT-40水溶液で全量を100gとし、pHを10.0に調整した。以下、実施例1と同様のカプセル化工程を経てマイクロカプセルを得た。得られたマイクロカプセルを坪量40g/m²の上質紙に塗抹することにより発色良好な感圧複写紙用上用紙が得られた。

実施例3

実施例1と同様にして菌体内成分の溶出処理工程を経て得られた酵母菌残渣を細胞壁溶解処理工程としてpH6.5に調整したリン酸-水酸化ナトリウムバッファーで100gとし、その分散液中にザイモリエース20Tを8.0mg添加し、40℃で3時間加温、搅拌処理を行い酵母細胞壁の溶解処理を行った。処理終了後遠心分離及び水洗を2度行ない酵素溶液を排除し全量を100gとした後、pHを10.0（ザイモリエースがほとんど作用しないpH域）に調整した。次に実施例1と同様のカプセル化工程を経てマイクロカプセル及び感圧複写紙用上用紙を得た。

比較例

実施例1において、酵母細胞壁溶解処理工程を経ることなく酵母菌残渣分散液中に疎水性液体の乳化液を添加し同様にカプセル化を3時間行なったが、得られた酵母菌分散液中には酵母菌体内に内包しきれなかった乳化粒子が多量に残存していた。この分散液をそのまま実施例1と同様にして

感圧複写紙用上用紙を得た。

上記実施例及び比較例で得られた感圧複写紙用上用紙の発色性とマイクロカプセルの堅牢性を次の方法により評価比較した。

発色性：上用紙を市販の感圧複写紙用下用紙（三菱製紙製 三菱NCR紙スーパー品N-40）と対向させ、線圧15kg/cm²の圧力が加えられた1対のロール間に1回通過させて発色させ、1時間後の発色部分の発色濃度を市販の色差計（日本電色工業製カラーディファレンシャルメーターND-101DP型）を用いて測定した。（値が小さいほど発色濃度が高いことを示す）

堅牢性：上用紙と発色性試験で用いたものと同じ下用紙を塗布面が対向するように重ね合わせ、0.1kg/cm²の軽荷重を加え、105℃の雰囲気で12時間放置した後の下用紙面対向部分の反射率を測定し、発色部分の反射率とした。また、上用紙と対向させる事無く下用紙のみを同様の条件下で熱処理した際の下用紙面の反射率を未処理部分の反射率とし、下式により堅牢性の値を算出

した。評価は値が大きいものほどマイクロカプセル皮膜の堅牢性は優れている。すなわち皮膜の堅牢性に劣るものは、熱処理中にマイクロカプセルが破壊され内包されていた染料が対向する下用紙に転移する結果、反射率は低い値が得られ、堅牢性の値は小さくなる。

発色部分の反射率

$$\text{堅牢性} = \frac{\text{発色部分の反射率}}{\text{未処理部分の反射率}} \times 100 (\%)$$

糖溶出率：酵母細胞壁の溶解処理を施した分散液のろ液中の全糖量（グルコース換算値）をフェノール硫酸法で測定し、次の算式により糖溶出率を求めた。糖溶出率の値が大きいものほど細胞壁の溶解が進行していることを示している。

$$\text{糖溶出率} = \frac{\text{ろ液中の全糖量 (g)}}{\text{初期添加酵母醣化乾量 (g)}} \times 100 (\%)$$

以上の測定方法に基づき、各シートを評価した結果を表1に示す。

表1

	発色性 (%)	堅牢性 (%)	糖溶出率 (%)	総合 評価
実施例 1	56.2	95.8	3.8	◎
〃 2	50.2	88.0	10.5	◎
〃 3	39.8	75.2	35.3	○
比較例	73.4	54.3	50	×

総合評価の定義

◎：特性上非常に好ましいレベル

○：特性上好ましいレベル

×：特性上好ましくないレベル

(以下余白)

【発明の効果】

本発明により、酵母菌を利用したマイクロカプセルにおいて、その皮膜強度を自由に制御することが可能となった。例えば本発明によって製造されるマイクロカプセルを感圧紙用に応用した場合、コアセルベーション法や *in situ* 法と比較しても何等過色のない発色性と皮膜の堅牢性が得られるようになった。さらに、カプセル化前にマイクロカプセルの壁材となる酵母菌を酵母細胞壁溶解酵素で処理することにより、その操作を行なわない場合に比べ収取される疎水性液体が多量かつ迅速に内包されることが可能になった。

加えて、マイクロカプセルの皮膜特性を自由に制御することが可能となり、内包物の徐放性が制御できるようになったので前述の種々の用途において従来以上に有効に適用できるようになった。

代理人 浅村皓